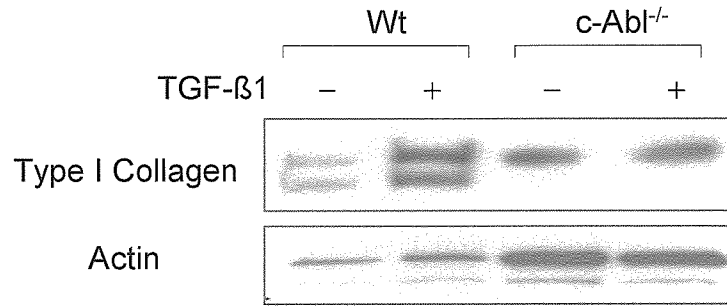
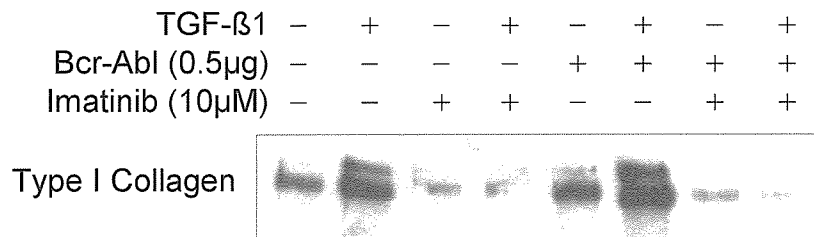


a



b



c

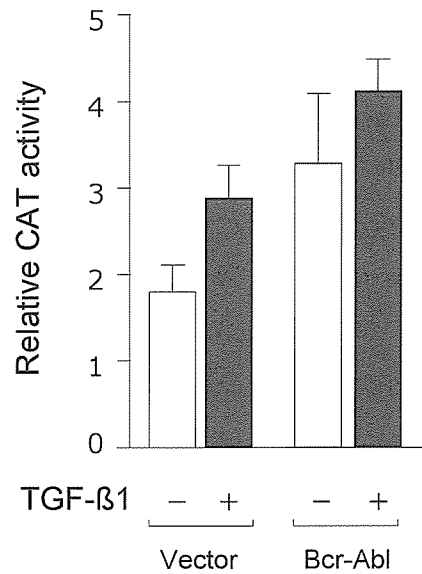


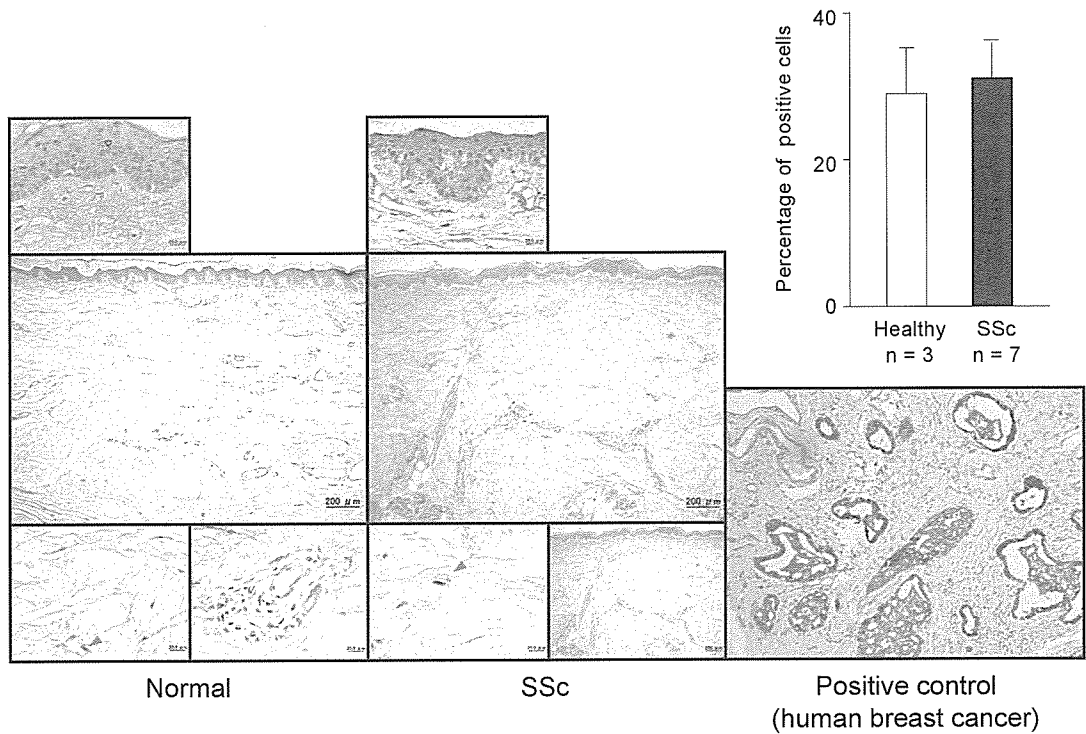
図1 : TGF-β 誘導性のコラーゲン増生においてc-Ablは相加的に働く

(a) c-Ablノックアウトマウス胎児線維芽細胞においてTGF-β 誘導性のI型コラーゲン増生が欠如した

(b) Bcr-Ablの一時的導入によりI型コラーゲン産生が増生した

(c) レポーター解析ではc-Ablの導入によりプロモーター活性が相加的に増加した

a



b

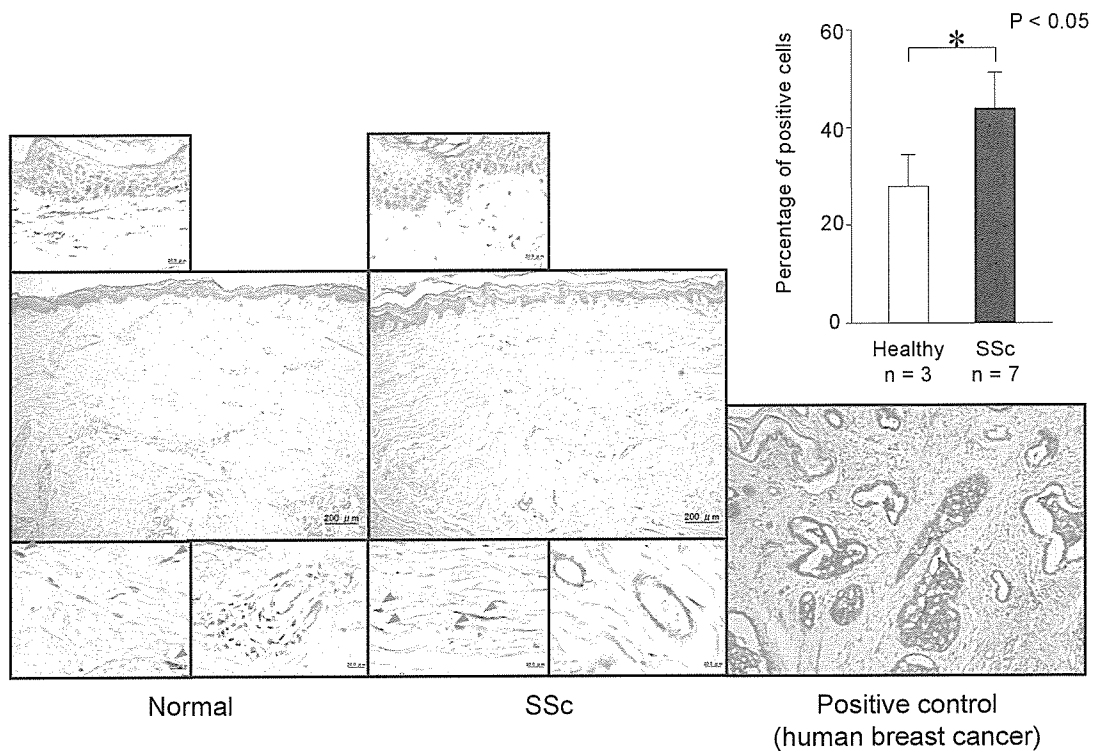
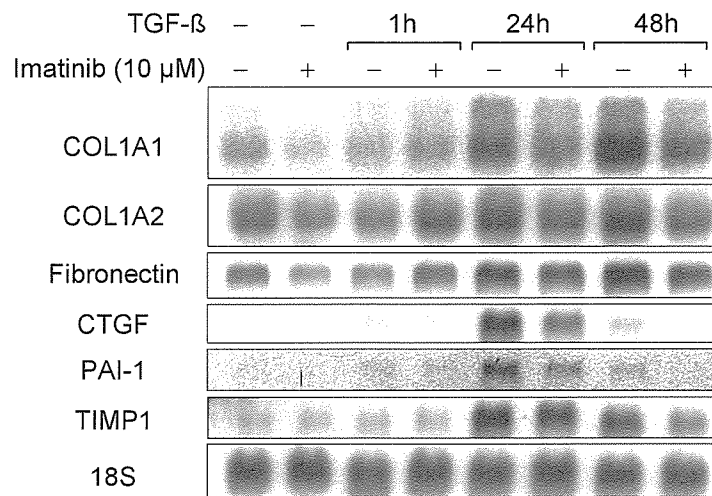
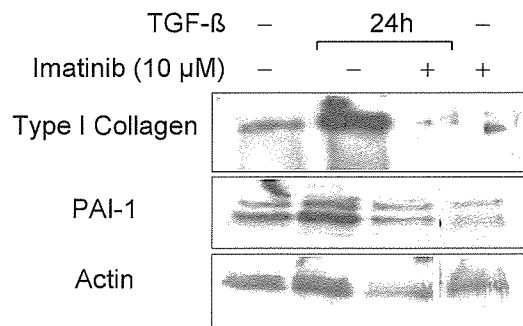


図2：SSc真皮において線維芽細胞のc-Ab1が有意にリン酸化された  
 (a)免疫組織染色によるc-Ab1陽性線維芽細胞数は健康者真皮とSSc患者真皮では差がなかった  
 (b)phospho-c-Ab1陽性線維芽細胞数はSSc患者真皮が有意に多かった

a



b



c

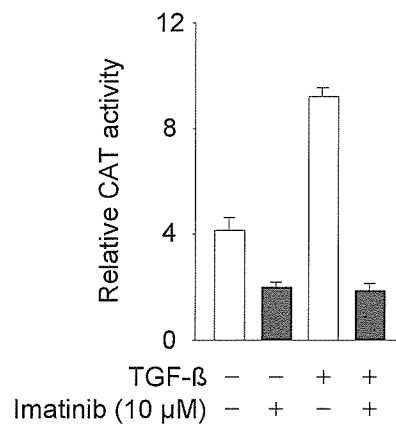
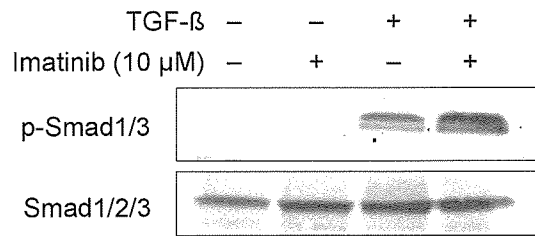


図3 : メシル酸イマチニブはTGF- $\beta$  誘導性の細胞外マトリクス蛋白のプロモーター活性や転写の亢進、強発現を抑制した

(a) TGF- $\beta$  誘導による細胞外マトリクス蛋白mRNAの増加をメシル酸イマチニブは抑制した (b) TGF- $\beta$  により強発現したI型コラーゲンとPAI-1をメシル酸イマチニブは阻害した (c) TGF- $\beta$  によるI型コラーゲンプロモーター活性の亢進をメシル酸イマチニブは阻害した

a



b

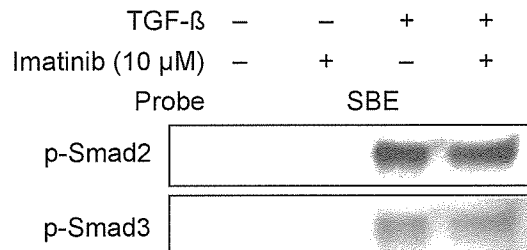


図4：メシル酸イマチニブはTGF- $\beta$ /Smadシグナル伝達系を介さずに作用する  
 (a) Western blot法によるphospho-Smad3の検出ではメシル酸イマチニブによる影響はなかった  
 (b) DNA affinity purification assayによる核内へのphospho-Smad2/3の集積の検出でもメシル酸イマチニブによる影響はなかった

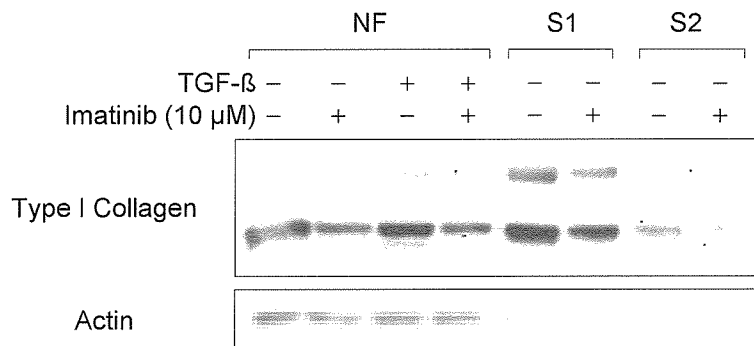


図5：SSc線維芽細胞の恒常的I型コラーゲン増生をメシル酸イマチニブは抑制する  
 NF：正常成人皮膚線維芽細胞 S1、S2：SSc患者皮膚線維芽細胞

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

抗RNAポリメラーゼIII抗体ELISAの有用性の検討

分担研究者	桑名正隆	慶應義塾大学医学部内科助教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
分担研究者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授
分担研究者	尹 浩信	熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学教授
分担研究者	遠藤平仁	北里大学医学部膠原病・感染内科学助教授
分担研究者	川口鎮司	東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター講師
分担研究者	後藤大輔	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫講師
分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
分担研究者	高橋裕樹	札幌医科大学第一内科講師
研究協力者	佐々木哲雄	国際医療福祉大学附属熱海病院皮膚科教授
研究協力者	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚結合組織病態学助教授
研究協力者	矢澤徳仁	東京大学大学院医学系研究科・医学部皮膚科学講師
協力者	佐藤隆司	慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター特別研究助手
協力者	高橋一夫	横浜市立大学大学院医学研究科環境免疫病態皮膚科准教授
協力者	三崎義堅	東京大学医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科講師
協力者	三森経世	京都大学大学院医学系研究科内科学講座臨床免疫学教授

## 研究要旨

抗RNAポリメラーゼ (RNAP) III 抗体の検出は強皮症の診断や病型分類に有用なことが広く知られている。最近、SRL社により抗RNAPIII抗体測定の特異免疫測定法 (ELISA) キットが開発された。そこで、その有用性を検討するため、強皮症 355 例、他の膠原病 245 例、健常人 102 例を対象とした多施設での臨床試験を行った。ELISA キットによる抗RNAPIII抗体陽性は強皮症 35 例 (9.9%)、他の膠原病 1 例 (0.4%) で、健常人は全例陰性であった。したがって、本キットの臨床的感度は 9.9% と低かったが、臨床的特異度は 99.6% ときわめて高かった。免疫沈降法の結果と比較すると ELISA 陽性の 36 例中 2 例は偽陽性で、分析特異度は 95% であった。強皮症病型による陽性頻度を比べると、diffuse 型 (16.8%) で limited 型 (3.4%) に比べて有意に高率であった。さらに、抗RNAPIII抗体は、広い皮膚硬化範囲、強皮症腎クリーゼ、高いスキンスコア、全身一般、皮膚、関節/腱の高い重症度と関連した。本試験により、抗RNAPIII抗体 ELISA キットが免疫沈降法に代わる簡便な臨床検査法であることが確認され、早期の臨床診断薬としての承認と一般診療への導入が望まれる。

## A. 研究目的

強皮症患者血清中にはトポイソメラーゼ I (トポ I) やセントロメアなど重要な生物活性を持つ核蛋白に対する自己抗体が高頻度に検出される<sup>1)</sup>。これら自己抗体は強皮症に特異的なことから、診断の補助に用いられている。抗トポ I 抗体陽性例は肺線維症を伴う diffuse 型が多く、一方、抗セントロメア抗体陽性例は limited 型と関連し、内臓病変の頻度が少ない。そのため、これら自己抗体は強皮症の病型分類にも用いられている<sup>1,2)</sup>。

我々の研究グループは、RNA ポリメラーゼ (RNAP) を認識する自己抗体が強皮症に特異的に検出されることを世界に先がけて報告した<sup>3)</sup>。抗 RNAP 抗体の抗原認識パターンは多様で、強皮症に特異的な自己抗体は RNAPI/III、RNAPI/II/III、RNAPIII のみを認識することが知られ、RNAPIII に対する反応性が共通している。強皮症における抗 RNAPIII 抗体の陽性頻度には人種差があり、日本人の 5%程度に対して、欧米白人では 20%以上に達する<sup>4)</sup>。抗 RNAPIII 抗体は、臨床的に急速に皮膚硬化が進行する diffuse 型と強皮症腎と強く関連することから、強皮症の診断、病型分類に有用な自己抗体である<sup>1-3)</sup>。しかし、アイトープと培養細胞を用い、操作が煩雑な免疫沈降法が唯一の検出法であったため、一般検査室での抗 RNAPIII 抗体の測定が従来不可能であった。我々は抗 RNAPIII 抗体の簡便なアッセイの開発をめざし、強皮症患者血清中の抗 RNAPIII 抗体により高頻度に認識されるエピトープの同定をめざしてきた。その結果、RNAPIII の最も分子量の大きいサブユニットである RPC155 のアミノ酸配列 891 番から 1080 番目に主要なエピトープが存在することを見だし、そのエピトープ部分を含むリコンビナント蛋白 RPC155C-g を抗原とした酵素免疫測定法 (ELISA)

を確立した<sup>5)</sup>。さらに、海外の施設との共同研究により、我々の確立した ELISA システムの臨床的有用性を確認した<sup>6)</sup>。これらの成績に基づいて、最近、SRL 社が RPC155c-g を抗原とした ELISA キットを開発した。そこで、今回多施設共同の臨床試験により SRL 社により開発された抗 RNAPIII 抗体 ELISA キットの性能を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 対象

本試験に参加した 15 施設に通院中の強皮症患者 355 例 (diffuse 型 173 例、limited 型 179 例、その他 3 例) を対象とした。対照として、強皮症以外の膠原病 245 例 (SLE122 例、多発性筋炎 9 例、皮膚筋炎 46 例、関節リウマチ 29 例、原発性シェーグレン症候群 22 例、混合性結合組織病 12 例、ベーチェット病 3 例、好酸球性筋膜炎 1 例、大動脈炎症候群 1 例)、健常人 102 例を用いた。本研究はすべての参加施設での倫理委員会で承認を受け、患者から文書による同意を得た上で検体を採取した。

### 2) 強皮症関連自己抗体の測定

抗 RNAPIII 抗体は SRL 社の ELISA キットにより測定した。抗トポ I 抗体、抗セントロメア抗体は市販の ELISA キット (SRL 社、MBL 社) を用いて測定した。

### 3) 免疫沈降法による抗 RNAP 抗体の測定

<sup>35</sup>S 標識メチオニン存在下で白血球細胞株 (K562 細胞) を 16 時間培養し、その細胞抽出液を抗原として用いた。一方、被検血清は Protein A sepharose と反応させ、洗浄後に <sup>35</sup>S 標識細胞抽出液と反応させた。免疫沈降物は 8.5% ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画後、オートラジオグラフィーにより検出した。

#### 4) 統計学的検討

2 群間の比較は Mann-Whitney 検定または Fisher 検定を用いた。強皮症関連自己抗体間の相関は線形回帰分析により求めた。p<0.05 を有意とした。

### C. 研究結果

#### 1) ELISA キットによる抗 RNAPIII 抗体の検出

強皮症 355 例、他の膠原病 245 例、健常人 102 例における抗 RNAPIII 抗体 ELISA の測定結果を図 1 に示す。本キット開発時の暫定カットオフ値は 4.4 ユニットであったが、今回の臨床試験における健常人の平均+5×標準偏差は 1.6 ユニットと大きく解離を認めた。実際に、強皮症 6 例と他の膠原病 1 例が 1.6-4.4 ユニットに分布したことから、適切なカットオフ値設定のために、1 ユニット以上の全症例と 1 ユニット以下の一部の症例を対象に免疫沈降法による解析を行なった。その結果、免疫沈降法により層別化された抗 RNAPIII 抗体の有無を反映するカットオフ値として 2 ユニットの値を設定した。このカットオフ値を用いると、強皮症 355 例中 35 例 (9.9%) で抗 RNAPIII 抗体が陽性となった。一方、他の膠原病で陽性となったのはわずか 1 例 (0.4%)、健常人は全て陰性であった。抗 RNAPIII 抗体 ELISA キットの臨床的感度は 9.9%、陰性的中度は 43.3% と低かったが、特異度は 99.6%、陽性的中度が 97.6% ときわめて高かった。一方、免疫沈降法の結果と照らし合わせると、ELISA 陽性者 36 例中偽陽性例が強皮症で 1 例、他の膠原病(関節リウマチ)で 1 例認められ、分析特異度は 95% であった。また、免疫沈降法で抗 RNAPIII 抗体陽性例であった 35 例のうち強皮症 1 例で ELISA 陰性の結果が得られた。

#### 2) 強皮症関連自己抗体間の相関

ELISA キットによる抗 RNAPIII 抗体の測定結果を強皮症関連自己抗体である抗セントロメア抗体と抗トポ I 抗体の結果と比較した。これら 3 種の強皮症関連抗体はいずれも排他的で併存はきわめて少なかった。ただし、抗 RNAPIII 抗体陽性例中に抗セントロメア抗体を併存する一群 8 例があり、注目された。

強皮症 355 例のうち、抗セントロメア抗体は 114 例 (32.3%)、抗トポ I 抗体は 109 例 (30.9%) で検出された。いずれかが陽性であった症例は 211 例 (59.8%) であり、抗 RNAPIII 抗体を加えることにより強皮症における自己抗体検出率が、237 例 (67.1%) へと上昇した。

#### 3) 抗 RNAPIII 抗体の臨床症状との関連

抗 RNAPIII 抗体の diffuse 型における陽性率は 16.8% であり、limited 型の 3.4% に比べて有意に高かった (p<0.0001)。各臨床所見の有無で層別化した 2 群間での抗 RNAPIII 抗体頻度の比較では、体幹、上腕、前腕、手背の皮膚硬化あり、スキンスコア高値が抗 RNAPIII 抗体と関連する所見として抽出された (いずれも p<0.0001)。自他覚症状、臓器病変との関連では、抗 RNAPIII 抗体は、強皮症腎クリーゼと関連したが (p=0.03)、指尖潰瘍、息切れ・動悸、胸焼け・逆流・食物のつかえ、逆流性食道炎、心伝導障害、心筋運動障害、肺高血圧症、シェーグレン症候群、手足先端部虫喰い状癬痕、肺線維症、レイノー現象、爪上皮内出血点との有意な関連を認めなかった。一方、重症度分類では、抗 RNAPIII 抗体陽性例は陰性例に比べて、全身一般 (p=0.01)、関節 (p=0.02)、皮膚 (p<0.0001) の重症度が有意に高く、腎病変については高い傾向を認めた (p=0.051)。

### D. 考案

抗 RNAPIII 抗体の測定はこれまでアイソトー

プを用い操作が煩雑な免疫沈降法により行なわれてきた。そのため、簡便で迅速、さらに再現性の高い ELISA での測定が望まれていた。今回用いた SRL 社により開発された ELISA キットの原理は以前に報告されたものであり<sup>6)</sup>、すでに同じ原理を用いたキットが海外で発売されている。

抗 RNAPIII 抗体 ELISA キットでの抗 RNAPIII 抗体の感度は 9.9%と低かったが、日本人強皮症患者における免疫沈降法を用いた過去の報告でも、抗 RNAPIII 抗体陽性率は 5%程度であり<sup>4, 6)</sup>、むしろ高い傾向を示した。その理由として今回の diffuse 型あるいは腎クリーゼの既往をもつ強皮症患者を優先的にエントリーした可能性が考えられる。日本人強皮症患者の抗 RNAPIII 抗体の陽性率は欧米白人に比べて低く、今回の検出感度は妥当と考えられる。一方、本キットの臨床的特異度は 99.6%、陽性的中度は 97.6%と高く、強皮症における有用性が確認された。しかし、抗 RNAPIII 抗体検出の” gold standard”である免疫沈降法との比較では、本キットの分析特異度は 95%であり、少ないながらも偽陽性例が認められることが判明した。原因として抗原として用いた RPC155c-g は大腸菌で発現、精製しており、精製過程で混入した大腸菌成分との非特異的反応が考えられる。そのため、さらに純度の高い抗原を作製し、キットを改良していく必要がある。また、強皮症患者で偽陰性例が 1 例認められ、過去の報告と同様に<sup>6)</sup>、これら血清は RPC155c-g 以外のエピトープを認識する可能性が考えられた。これら一部に免疫沈降法との不一致が見られるものの、本 ELISA キットは免疫沈降法を代用しうると考えられた。

従来から知られているように<sup>1)</sup>、強皮症関連自己抗体の併存は少ないことが確認された。したがって、抗セントロメア抗体、抗トポ I 抗体に加え

て、抗 RNAPIII 抗体を測定する本キットを導入することにより、強皮症患者における自己抗体の陽性率が増加し、強皮症診断の補助として有用であることが示された。

本キットにより検出される抗 RNAPIII 抗体と強皮症患者の臨床症状を照らし合わせると、抗 RNAPIII 抗体陽性例は diffuse 型に多く、腎クリーゼが高頻度であり、免疫沈降法を用いた従来の報告と一致していた<sup>3, 4, 6)</sup>。つまり、抗 RNAPIII 抗体 ELISA キットを用いることが、病型分類や予後の予測、治療方針の決定に有用なことが確認された。今後、本キットが承認され、その使用が普及し、抗 RNAPIII 抗体の測定が広く行われるようになれば、強皮症患者診療に大きく貢献すると考えられる。

## E. 結論

抗 RNAPIII 抗体 ELISA キットは免疫沈降法に代わる抗 RNAPIII 抗体検出に有用な測定法であった。さらに、強皮症の病型分類、臨床症状と関連し、診断や予後推測に有用であった。

## F. 文献

1. Okano Y: Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996; 22: 709-735.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M: Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 75-83.
3. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest*



1993; 91: 1399-1404.

4. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Tojo T, Medsger TA Jr: Racial differences in the distribution of systemic sclerosis-related serum antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 902-906.
5. Kuwana M, Kimura K, Kawakami Y: Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2742-2747.
6. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, Silver RM, Fertig N, Medsger TA Jr: Enzyme-linked

immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody: analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2425-2432.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

桑名正隆：強皮症と抗 RNA ポリメラーゼ抗体。  
第 50 回日本リウマチ学会総会（長崎）。2006. 4.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

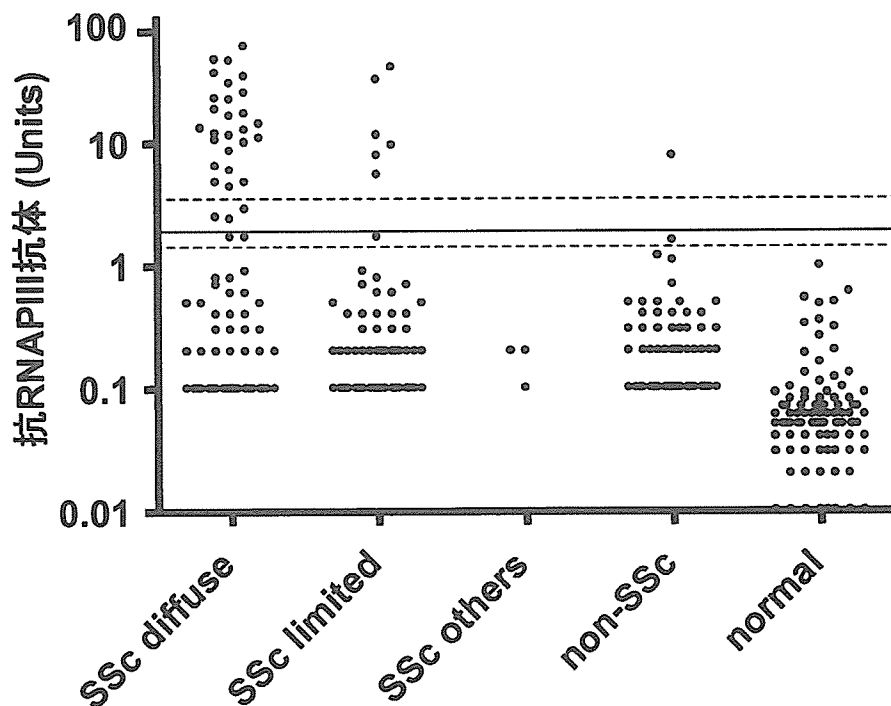


図 1 : ELISA キットによる抗 RNAPIII 抗体の測定。実線はカットオフ値(2 ユニット)、上段点線は 4.4 ユニット、下段点線は 1.6 ユニットの示す。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

強皮症患者における抗 CCP 抗体の臨床的意義

研究協力者	室 慶直	名古屋大学大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学助教授
協力者	森田有紀子	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学
	杉浦一充	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学講師
	富田 靖	名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

抗 cyclic citrullinated peptide 抗体（抗 CCP 抗体）は、関節リウマチ患者（RA）に特異的に検出される疾患マーカーである。今回、我々は強皮症患者における抗 CCP 抗体の臨床的意義を調べるため、強皮症単独患者(SSc)113例、RA患者14例、強皮症と関節リウマチの合併患者(SSc-RA)8例、シェーグレン症候群患者(SjS)24例に対し抗 CCP 抗体価を ELISA で測定した。抗体陽性率は、それぞれ疾患別に SSc で 1.8%、RA で 64%、SSc-RA で 88%、SjS で 4.2%であり、SSc-RA では SSc より有意に抗体価が高かった。抗 CCP 抗体が強皮症患者全体の中で、SSc-RA を検出する感度は 88%、特異度は 98%であり、他の RA 疾患マーカーより優れていた。また、抗 CCP 抗体陽性者では、有意に関節痛と間質性肺炎の合併率が高かった。結論として、抗 CCP 抗体は、SSc-RA と SSc を鑑別するための有用なマーカーとなりうる。

A. 研究目的

強皮症患者では、しばしば筋骨格系の病変を合併する。臨床的に関節痛、関節炎、筋痛、筋萎縮などが認められ、X 線上、骨減少、関節裂隙の狭小化、骨びらん、不全脱臼なども認められる<sup>1)-3)</sup>。過去の報告では、強皮症患者の 13%(10/76)に関節炎が認められ、関節近傍の骨粗鬆症や関節裂隙の狭小化、指の屈曲拘縮が手で顕著にみられるとされている<sup>4)</sup>。一方、強皮症患者では、しばしば関節リウマチ (RA) を合併する（強皮症、関節リウ

マチ合併症候群: SSc-RA)。Horiki らは、SSc-RA では、汎発型の皮膚硬化、重症の多関節炎、肺線維症を合併することが多く、強皮症単独患者(SSc)とは異なる疾患群であるとしている<sup>5)</sup>。SSc-RA も SSc も関節炎を起こしうるため、より強い機能障害を持つ SSc-RA を SSc と鑑別することは、臨床的に重要である。

RA の診断は、臨床症状やリウマトイド因子(RF)の有無によるが、RF の感度は、60-80%、特異度は 48-92%と低い。また、RF は感染症などの非リウマ

子性疾患や、高齢者、健康成人でも検出されうる。近年、matrix metalloproteinase-3(MMP-3)や抗ガラクトース欠損IgG抗体(AG-IgG)もRAの疾患マーカーとして使用されている<sup>6)-8)</sup>。

RAの自己抗体は多数あるが、それらはRAの診断、予後マーカーとして有用であるとされている<sup>9)</sup>。最近、抗cyclic citrullinated peptide抗体(抗CCP抗体)のRAにおける有用性が多数報告されている<sup>10)-12)</sup>。また、抗CCP抗体は、RAに対する感度が76%、特異度が96%と高く<sup>13)</sup>、seronegative RAでも検出される。更に、抗CCP抗体は関節破壊の予測因子であることも知られており<sup>14)-15)</sup>、RAの予後を予測する疾患マーカーであると認識されている<sup>16)</sup>。

今回、我々は、抗CCP抗体価によりSSc-RAとSScを鑑別することができるかどうかを検討し、更に、強皮症患者における抗CCP抗体の臨床的意義についても検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象は名古屋大学医学部附属病院皮膚科に通院中の強皮症患者121例で、その内訳は、diffuse cutaneous SSc(dSSc)34例、limited cutaneous SSc(lSSc)87例であった。そのうち、SSc単独例が113例、SSc-RA合併例が8例であり、ほかにRA患者14例、シェーグレン症候群患者(SjS)24例についても検討を行った。男女比は男性15例、女性144例で、平均年齢56歳(18-83歳)であった(表1)。RAの診断は、アメリカリウマチ協会の関節リウマチ診断基準<sup>17)</sup>により行い、SScの診断は、厚生労働省の強皮症新診断基準(竹原斑、2003年)

<sup>18)</sup>により行った。

### 2) ELISA

抗CCP抗体価はAxis-Shield社のELISAキット(DISTAT<sup>TM</sup> Anti-CCP)を用いて測定した。MMP-3の測定には、第一ファインケミカル社のELISAキット(パナクリアMMP-3)を、AG-IgGの測定には、三光純薬株式会社のELISAキット(エイテストCA・RF)を用いた。

### 3) 統計学的解析

各群の抗CCP抗体価の平均値の比較には、Mann-Whitney U検定を用い、関節痛や間質性肺炎の陽性率の検定には、Fisherの正確確率検定を用いた。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意とした。

## C. 研究結果

### 1) 抗CCP抗体価

図1に、各疾患群における抗CCP抗体価を示した。SSc-RA群では、SSc群に比して抗CCP抗体価が有意に高かった(平均値±SD:  $60.71 \pm 68.40$  vs.  $0.97 \pm 3.21$ U/ml,  $P < 0.001$ )。RA群でも、SSc群に比して抗CCP抗体価が有意に高かった(平均値±SD:  $64.58 \pm 90.34$  vs.  $0.97 \pm 3.21$ U/ml,  $P < 0.001$ )。SSc-RA群とRA群で抗CCP抗体価に有意な差は認めなかった( $P = 0.441$ )。SjS群の抗CCP抗体価は $0.89 \pm 3.01$ U/mlであった。カットオフ値を5U/mlとすると、抗体陽性率は、それぞれSScで1.8%(2/113)、RAで64%(9/14)、SSc-RAで88%(7/8)、SjSで4.2%(1/24)であった。

### 2) 抗CCP抗体陽性患者の臨床的特徴

表2に抗CCP抗体陽性のSSc、SSc-RA患者における臨床的特徴を示した。6例がdSScで、3例が

ISScであった。全9例とも関節痛を有し、抗核抗体陽性であった。9例中8例は、間質性肺炎を有し、RFとAG-IgGが陽性であった。また、9例中7例はMMP-3が高値を示した。

一方、抗CCP抗体価が正常のSSc、SSc-RA患者中、関節痛陽性者は21%(23/107)、間質性肺炎陽性者は36%(38/107)であった。抗CCP抗体陽性のSSc、SSc-RA患者では、抗体価正常者に比して、有意に関節痛( $P<0.001$ )と間質性肺炎( $P<0.005$ )の合併率が高かった。

### 3)MMP-3とAG-IgG

MMP-3が高値を示したのは、SSc例中18%(20/113)、SSc-RA例中63%(5/8)であった。MMP-3の正常値は男性で36.9~121ng/ml、女性で17.3~59.7ng/mlとした。MMP-3高値例の男女比は、男性3例、女性22例で、平均年齢は60歳(39-83歳)であった。一方、AG-IgG陽性者は、カットオフ値を6.0AU/mlとすると、SSc例中19%(22/113)、SSc-RA例中75%(6/8)であった。AG-IgG陽性例の男女比は、男性2例、女性26例で、平均年齢は60歳(39-83歳)であった。

### 4)SSc-RAの診断マーカー

強皮症患者全体からSSc-RAを診断するための診断マーカーとマーカー別の感度、特異度、陽性反応適中率、陰性反応適中率を表3に示した。抗CCP抗体の感度、特異度、陽性反応適中率、陰性反応適中率はそれぞれ、88%、98%、77%、99%であった。

## D. 考察

強皮症患者は、しばしば、関節痛、関節炎、筋痛、筋萎縮といった筋骨格系症状を有することがある。また、近年、RA合併の強皮症患者の症例も

報告されており<sup>19)-20)</sup>、強皮症単独患者より機能障害や関節痛が強いとされている<sup>5)</sup>。Horikiらは15例のSSc-RA患者についてまとめており、これらの全ての患者はびらん性多関節炎を持ち、RF陽性であった。また、このうち、87%(13/15)は肺線維症を合併しており、80%(12/15)はdSScであった。Doranらは、4例のSSc-RA患者について検討し、全例でX線上手に骨びらんを認め、肺線維症を合併していたと報告している<sup>21)</sup>。

我々は、以前HAQ(Health Assessment Questionnaire)に関する研究を行ったところ、SSc-RA患者ではHAQ-DI(disability index)がSSc患者より高値を示しており、より強い機能障害を持つことが明らかになった(unpublished observation)。よって、強皮症患者の中からSSc-RA患者を鑑別する指標を見つけることは、機能障害の強いSSc-RA患者を早期に発見し、治療を始めるためにも重要である。本研究では、抗CCP抗体価によりSSc-RAとSScを鑑別することができるかどうかを検討し、更に、強皮症患者における抗CCP抗体の臨床的意義や診断精度についても検討を行った。

まず始めに、SSc-RA群では、SSc群に比して抗CCP抗体価が有意に高かったことは特筆すべきである。Ingegnoliらは、強皮症患者における抗CCP抗体陽性率は10.6%(8/75)であると報告しているが<sup>22)</sup>、彼らは対象患者をSSc単独例とSSc-RA例を明確に区別していないため、母集団にSSc-RA例が混在している可能性がある。そのため、本来のSSc単独患者における抗CCP抗体陽性率はより低いことが予測される。

次に、抗CCP抗体のSSc-RAに対する感度、特異

度、陽性反応適中率、陰性反応適中率はそれぞれ、88%、98%、77%、99%であった。MMP-3やAG-IgGと比較しても、抗CCP抗体はSSc-RAを診断するのに有用であるといえよう(表3)。本研究では、SSc単独例とSSc-RA例を明確に区別して対象患者にしているため、抗CCP抗体が、SSc-RAとSScを鑑別するための有用なマーカーとなりうる事が分かる。

最後に、抗CCP抗体が陽性のSSc、SSc-RA患者では、ほぼ全例に関節痛と間質性肺炎が認められた。このことから、強皮症患者において抗CCP抗体が関節病変や間質性肺炎と関連する可能性が示唆される。但し、本研究では、dSSc患者でRAの合併率がISScより高いため(15%、5/34 vs. 3%、3/87;  $P<0.05$ )、強皮症の病型が結果に関与している可能性も考えられる。抗CCP抗体と関節病変や間質性肺炎との関連を明確にするためには、症例を増やしての更なる検討が必要である。

## E. 結論

抗CCP抗体は、SSc-RAとSScを鑑別するための有用なマーカーとなりうる。

## F. 文献

1. Medsger TA. Progressive systemic sclerosis: skeletal muscle involvement. *Clin Rheum Dis* 1979; 5: 103-113.
2. Blocka K. Organ involvement: musculoskeletal. In: Clements PJ, Furst D, ed. *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1996:411-424.
3. Seibold JR. Scleroderma and mixed connective

tissue diseases. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, ed. *Kelley's textbook of rheumatology*, 6th edn. Philadelphia: WB Saunders, 2001: 1211-1239.

4. La Montagna G, Sodano A, Capurro V, Malesci D, Valentini G. The arthropathy of systemic sclerosis: a 12 month prospective clinical and imaging study. *Skeletal Radiol* 2005; 34: 35-41.
5. Horiki T, Moriuchi J, Takaya M, et al: The coexistence of systemic sclerosis and rheumatoid arthritis in five patients. Clinical and immunogenetic features suggest a distinct entity. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 152-156.
6. Yoshihara Y, Obata K, Fujimoto N, Yamashita K, Hayakawa T, Shimmei M. Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 969-975.
7. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun* 1989; 2: 101-114.
8. Sumar N, Bodman KB, Rademacher TW et al. Analysis of glycosylation changes in IgG using lectins. *J Immunol Methods* 1990; 131: 127-136.
9. Van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis*

Res 2002; 4:87-93.

10. Jansen AMA, van der Horst-bruinsama IE, van Schaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning M-HMT, Dijkmans BAC. Rheumatoid factor and autoantibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29:2074-2076.

11. Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-lombard P, Guerne PA. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology* 2002; 41: 809-814.

12. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villata D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 2001; 47: 1089-1093.

13. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-281.

14. Meyer O, Labarre C, Dougados M, et al: Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 120-126.

15. Forslind K, Ahlmen M, Eberhardt K, Hafstrom

I, Svensson B, for the BARFOT Study Group.

Prediction of radiological outcome in early rheumatoid arthritis in clinical practice: role of antibodies to citrullinated peptides (anti-CCP). *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1090-1095.

16. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 709-715.

17. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.

18. [http://www.nanbyou.or.jp/pdf/019\\_s.pdf](http://www.nanbyou.or.jp/pdf/019_s.pdf)

19. Zimmermann C, Steiner G, Skriner K, Hassfeldt W, Petera P, Smolen JS. The concurrence of rheumatoid arthritis and limited systemic sclerosis: clinical and serologic characteristics of an overlap syndrome. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1938-1945.

20. Tuffanelli DL, Winkelmann RK. Systemic scleroderma: a clinical study of 727 cases. *Arch Dermatol* 1961; 84: 359-371.

21. Doran M, Wordsworth P, Bresnihan B, Fitzgerald O. A distinct syndrome including features of systemic sclerosis, erosive rheumatoid arthritis, anti-topoisomerase antibody, and rheumatoid factor. *J Rheumatol* 2001; 28: 921-922.

22. Ingegnoli F, Galbiati V, Zeni S, Zeni S, et al. Use of antibodies recognizing cyclic citrullinated peptide in the differential diagnosis of joint involvement in systemic sclerosis. Clin Rheumatol (in press).

## G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

森田有紀子、室慶直、杉浦一充、富田靖: 強皮症患者における抗CCP抗体の臨床的意義. 第10回強皮症研究会議合同会議(東京). 2007.1.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図 1.

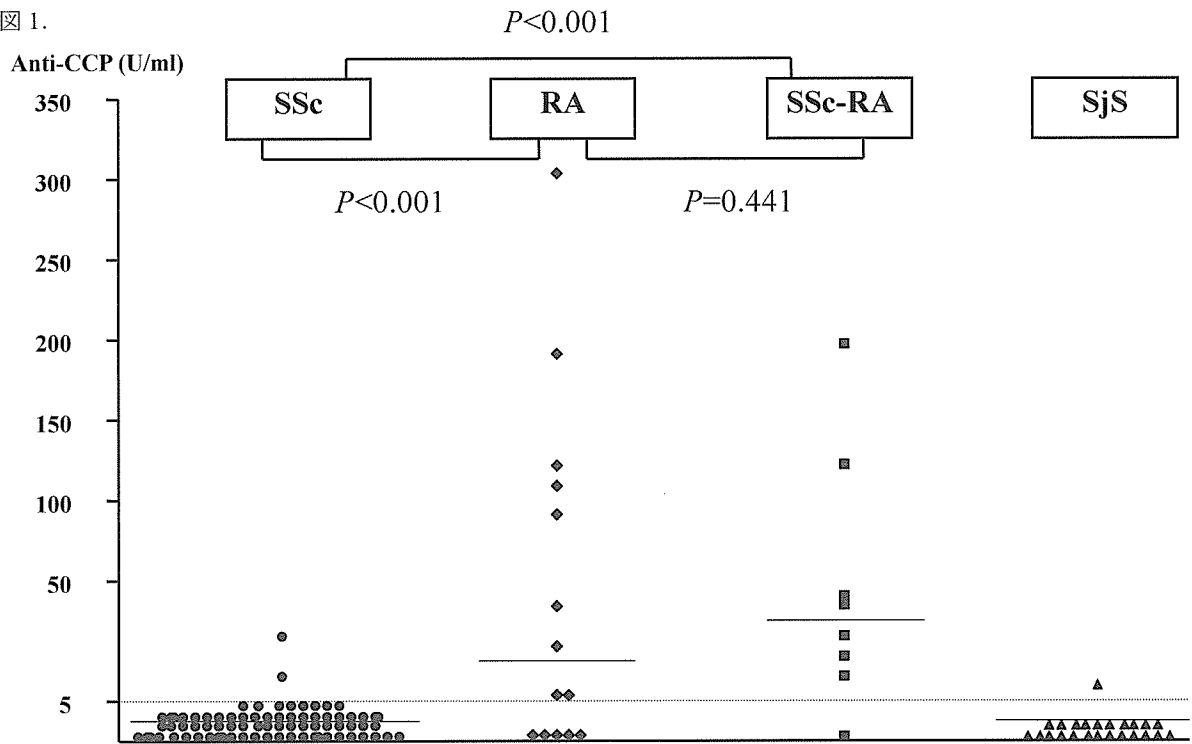


図1：各疾患における血清中抗CCP抗体価。実線は中央値を示す。点線はカットオフ値（5U/ml）を示す。平均値の比較にはMann-Whitney検定を用いた。

SSc, systemic sclerosis; RA, rheumatoid arthritis; SSc-RA, SSc-RA overlap syndrome; SjS, Sjögren syndrome

表 1. 患者背景

疾患	患者数	性別		Age	
		男性	女性	歳	平均±標準偏差
SSc	113	9	104	19 - 83	57 ± 11
RA	14	2	12	35 - 76	56 ± 11
SSc-RA overlap	8	0	8	39 - 68	57 ± 8.7
SjS	24	4	20	18 - 81	51 ± 17

SSc, systemic sclerosis; lSSc, RA, rheumatoid arthritis; SjS, Sjögren syndrome



表 2. 抗 CCP 抗体陽性患者の臨床的特徴

No.	年齢	性別	疾患	PSL 内服量 (mg/day)	関節痛	間質性 肺炎	CRP (mg/dl)	RF	抗核抗体	CCP (U/ml)	MMP3 (ng/ml)	AG IgG (AU/ml)
1	50	男	dSSc	17.5	+	+	0	+	SS-A	31	195	240
2	75	女	dSSc	7.5	+	+	0.44	-	Topo-1	15	290	8
3	63	女	lSSc, RA	5	+	-	2.9	2+	ACA	200	480	4.3
4	52	女	lSSc, RA	5	+	+	3.4	2+	ACA	22	155	370
5	39	女	dSSc, RA	4	+	+	0.1	2+	Topo-1	18	245	120
6	68	女	dSSc, RA	0	+	+	0	+	Topo-1	130	9	6.2
7	58	女	dSSc, RA	6	+	+	8.5	2+	Topo-1	30	82	200
8	56	女	lSSc, RA	10	+	+	2.91	+	Topo-1	40	110	26
9	62	女	dSSc, RA	10	+	+	0.72	+	Nuclear speckled and cytoplasmic	45	35	25.5

SSc, systemic sclerosis; lSSc, limited cutaneous SSc; dSSc, diffuse cutaneous SSc; RA, rheumatoid arthritis; PSL, prednisolone; SS-A, anti-SS-A antibody; Topo-1, anti-topoisomerase 1 antibody; ACA, anti-centromere antibody; CCP, serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibody; MMP-3, serum levels of matrix metalloproteinase-3; AG-IgG, serum levels of anti-agalactosyl IgG antibodies

表 3. SSc-RA の診断マーカー

陽性	CCP	MMP-3	AG-IgG	MMP-3 and/or AG-IgG	CCP and/or MMP-3	CCP and/or AG-IgG
感度 (%)	88	63	75	88	88	88
特異度 (%)	98	82	81	68	82	81
陽性反応適中率 (%)	77	20	21	16	26	24
陰性反応適中率 (%)	99	97	98	99	99	99

CCP, anti- cyclic citrullinated peptide antibody; MMP-3, matrix metalloproteinase-3; AG-IgG, anti-agalactosyl IgG antibodies;

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

全身性強皮症合併間質性肺炎における血清KL-6とSP-Dの相違点

研究協力者	安井正英	金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講師
分担研究者	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

血清KL-6およびサーファクタントプロテインD（SP-D）は、全身性強皮症合併間質性肺炎（SSc-IP）の病態に関連していることが多数報告されている。しかし、両者を比較検討は少なく、相違点を見いだすことを目的に検討を行った。SSc-IP73名を対象とし、KL-6値およびSP-D値をそれぞれのカットオフ値で除し、A群（1未満）、B群（1-2）、C群（2-3）、D群（3以上）に分類した。各群間の罹病期間、呼吸機能検査値およびBALF細胞所見を比較検討した。罹病期間では、KL-6 D群はA群より有意に長かった。呼吸機能検査では、KL-6およびSP-Dの上昇に伴い、%VC、%RV、%TLC、%DLcoが低下した。またその差はSP-Dの方が大きい傾向にあった。しかし、C群とD群の比較では、KL-6においてのみ%RVが有意に低下した。BALF細胞分画では、KL-6、SP-Dの上昇にともない好中球比率が増加した。SP-Dでは好酸球比率も増加を認めた、以上より、SSc-IPの早期ではSP-D、進行期ではKL-6が病態とより関連していることが示唆された。

A. 研究目的

KL-6およびサーファクタントプロテインD（SP-D）は、主としてII型肺胞上皮細胞に発現あるいは産生されている。そして、血清KL-6およびSP-Dは、各種間質性肺炎の診断、活動性の評価、予後の推測や治療効果判定等重要な指標となってきた<sup>1,2</sup>。全身性強皮症（SSc）において、間質性肺炎（IP）の合併率が高くかつ重要な予後規定子であるが、SSc-IPの血清KL-6あるいはSP-Dに関する報告も増えてきている。それらの報告では、KL-6<sup>3-6</sup>あるいはSP-D<sup>7-9</sup>は、IP合併例で高

値を示し、%VCや%DLcoと負の相関を認めたことから、それぞれ臨床的に有用な指標であるとされている。しかし、SSc-IPの経過中2つのマーカーが解離した変動を示し、解釈が難しいことをしばしば経験している。これまで2つのマーカーを同時に検討した報告<sup>10</sup>は少なく、KL-6とSP-Dの相違点は明らかではない。そこで、SSc-IPにおける血清KL-6とSP-Dの臨床的相違点を明らかにすることを目的に本研究を行った。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者および群分け

金沢大学医学部附属病院において精査が行われたSSc患者の内、血清KL-6、SP-D、呼吸機能検査および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞所見が検討できた73例 (男性24例, 女性49例, 平均年齢56歳) を対象とした。各マーカーのカットオフ値 (KL-6 500 IU/ml, SP-D 110 ng/ml) で除し, A群 (1未満), B群 (1以上2未満), C群 (2以上3未満), D群 (3以上) に分類した。

### 2) KL-6, SP-Dの測定

KL-6は, エイテストKL-6を用いELISA法にて測定を行った。SP-Dは, SP-Dキット「ヤマサ」EIAを用いて測定を行った。各マーカーのカットオフ値 (KL-6 : 500 IU/ml, SP-D : 110 ng/ml) で除した値を補正マーカー値として解析に用いた。

### 3) 呼吸機能検査

肺活量 (%VC), 残気量 (%RV), 全肺気量 (%TLC), 残気率 (RV/TLC), 拡散能 (%DLco) および拡散能/肺胞気量 (%DLco/V<sub>A</sub>) を検討に用いた。

### 4) 気管支肺胞洗浄液細胞所見の解析

BALF は, 気管支鏡先端を IP の存在する区域気管支に挿入し, 生理的食塩水 50 ml を注入・吸引する操作を計 3 回行い回収した。各フラクションごとに回収した BALF に関して, 細胞数を求め, サイトスピン標本を作製後ギムザ染色を行なった。各フラクションごとの標本を光学顕微鏡 1000 倍下に 300 個カウントし, 細胞比率を算出した。フラクション 3 を肺胞領域の BALF 細胞所見として解析

に用いた。

## C. 研究結果

### 1) KL-6/500とSP-D/110の相関 (図1)

KL-6/500およびSP-D/110の相関をみると, 有意な正の相関が認められた (図1左)。KL-6の群分けし, (KL-6/500) / (SP-D/110) を算出すると, A, B, C群では約0.8で差は認められなかった。しかし, D群においては約2.0と他の群に比して有意な上昇を認めた。 (図1右)

### 2) 罹病期間の比較 (図2)

KL-6において, D群はA群より有意に罹病期間が長かった。また, C群においても長い傾向が認められた。一方, SP-Dについてはいずれの群間にも有意差は認められなかった。

### 3) 呼吸機能検査値の比較

%VCでは, KL-6およびSP-DともにA群に比べD群は有意に低値であった。さらに, SP-DではB群およびC群においても有意差を認めた。%RVでは, KL-6およびSP-DともにA群に比べ, B群, C群およびD群で有意に低値であった。さらに, KL-6ではD群がB群およびC群より有意に低値であった。 (図3)

%TLCでは, KL-6およびSP-DともにA群に比べB群, C群およびD群が有意に低値であった。また, D群とB群にも有意差が認められた。残気率では, KL-6およびSP-Dとも有意な差は認めなかった。 (図4)

%DLcoでは, KL-6およびSP-DともにA群に比べB群, C群およびD群が有意に低値であった。%DLco/V<sub>A</sub>では, KL-6ではA群に比べB群, C群およびD群が有意に低値であった。しかし,

SP-Dでは有意差は認めなかった。(図5)

#### 4) BALF細胞所見の比較(図6)

細胞数およびリンパ球比率に関しては、KL-6およびSP-Dとも群間に有意差は認められなかった。好中球比率では、KL-6およびSP-DともA群に比べD群で有意に高値であった。好酸球比率では、SP-DではC群がA群およびB群より有意に高値であったが、KL-6には有意差は認めなかった。CD4/CD8比は、KL-6およびSP-Dとも群間に有意差は認められなかった。

### D. 考案

KL-6とSP-Dは全体としては有意な正の相関を示すが、KL-6がカットオフ値の3倍以上ではSP-Dの上昇と解離してくることが判明した。さらに、罹病期間についてはKL-6のみ有意差が認められた。したがって、SSc-IPが進行した段階では両者の上昇の程度が異なってくると考えられる。SP-Dは約3倍程度で頭打ちになっていたが、SP-Dはリン脂質と結合した分泌型蛋白であるため、分泌には一定の限界があるのかもしれない。

呼吸機能検査における検討では、KL-6およびSP-Dとも上昇に伴い肺容積の縮小が認められた。低値群との比較では、SP-Dの方が差が大きい結果であった。一方、C群とD群の比較では、KL-6のみ%RVが有意に低下し、他の検査値でも低下する傾向が認められた。したがって、SP-DはSSc-IPの比較的早期病変の進行と相関し、進行期では相関が消失してくることが示唆された。一方、KL-6は早期ではSP-Dにくらべ相関は弱いですが、進行期において

もIPの進行と相関していることが推測された。

BALF細胞分画の検討では、SP-Dでは好中球および好酸球比率に有意差を認め、KL-6では好中球比率のみであった。また、平均値の推移をみても、SP-Dにおいては、A群、B群、C群までは徐々に増加が認められており、SP-Dの方がより関連していると考えられる。SSc-IPにおいては、BALF中好中球比率がCT上のIPの拡がり<sup>11</sup>や呼吸機能の悪化<sup>12</sup>と相関していることが報告されている。また、BALF中リンパ球比率が15%以上または好中球比率5%以上を認めた場合、積極的治療を行うことも推奨されている<sup>13</sup>。したがって、SSc-IP早期の炎症期においてはSP-Dがより反映していることが推測される。

SSc-IPは、比較的均一な間質性肺炎であり、皮膚病変と同様に早期は炎症が主体であり、次第に線維化を来してくるものと考えられる。今回の検討からは、SP-Dは早期の炎症期にはIPの病態とより関連しているが、線維化が出現してくる進行期においては、相関が弱くなっていくことが推測される。一方、KL-6は、早期の炎症期での相関はSP-Dに劣るものの、進行期でも病態を反映することが考えられる。今後KL-6とSP-Dの肺内での発現部位を検討することでより明らかになってくるものとする。KL-6とSP-Dは単なる類似した指標ではなく、SSc-IPの診療上両者を同時に評価していくことが重要であると考えられる。

### E. 結論

SSc-IPでは、早期にはSP-D、進行期ではKL-6がより病態と関連していることが示唆